Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 1, Apr. May. 2017, p. 141- 154

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۶ ص.۱۵۴-۱۴۱

بررسی تاثیر آغازگر *لاکتوباسیلوس* غالب جدا شده از خمیرترش سنّتی بر میزان بیاتی نان‌قالبی حاصل از آرد کامل گندم

عباس عابدفر[1]، علیرضا صادقی[2*]، مهدی کاشانی نژاد[3]، مرتضی خمیری[3]، مهران اعلمی[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۱/۲۰

چکیده

در این پژوهش پس از جداسازی آغازگر *لاکتوباسیلوس* غالب موجود در خمیرترش سنّتی حاصل از آرد کامل گندم و تائید شناسایی آن با استفاده از PCR دارای پرایمر اختصاصی، از آغازگر مذکور جهت تولید خمیرترش استفاده شد. سپس تاثیر زمان تخمیر (۸، ۱۶، ۲۴ ساعت) و مقدار شکر (۰/۵، ۱، ۱/۵درصد) بر فعالیت آغازگر *لاکتوباسیلوس* جدا شده مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از فرآوری نان قالبی با استفاده از تیمارهای خمیرترش، بیاتی نان‌های تولیدی در یک بازه زمانی چهار روزه (۲، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از پخت) براساس شاخص سفتی بافت (به روش بافت‌سنجی) مورد بررسی قرارگرفت. همچنین میزان تخلخل (به روش پردازش تصویر) و ویژگی‌های حسّی نان تازه‌خوری نیز با نمونه شاهد مقایسه شد. نتایج حاصل نشان داد که کمترین و بیشترین میزان سفتی بافت نان پس از ۹۶ ساعت به ترتیب مربوط به نمونه‌های فرآوری شده با خمیرترش تخمیر شده طی ۲۴ ساعت و دارای ۰/۵ درصد شکر و همچنین خمیرترش تخمیر شده طی ۸ ساعت و دارای ۱/۵درصد شکر بود. علاوه بر این، بیشترین مقدار تخلخل نان تازه‌خوری در نمونه حاصل از تخمیر ۲۴ ساعت خمیرترش و محتوی ۱/۵ درصد شکر و کمترین مقدار آن نیز در نمونه حاصل از ۸ ساعت تخمیر با محتوی ۰/۵ درصد شکر مشاهده گردید. پس از ارزیابی نتایج حاصل از این آزمون‌ها، رابطه بین عوامل موثر بر تخمیر خمیرترش به‌منظور بررسی خصوصیات بافتی نان‌های تولیدی بر اساس رفتار ویسکوالاستیک آن‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: نان خمیرترشی، بیاتی، تخلخل، آرد کامل گندم، آغازگر *لاکتوباسیلوس* غالب.

مقدمه

با در نظر گرفتن اهمیت نان در سبد خانوار، افزایش ارزش تغذیه-ای آن از مهم‌ترین اهداف صنایع نانوایی به شمار می‌آید (Izydorczyk & Dexter, 2008). یکی از معضلات اساسی در کاهش کیفیت این فرآورده، بیاتی است. بیاتی که بر اثر تغییرات فیزیکوشیمیایی در پوسته و مغز نان رخ داده و باعث کاهش پذیرش مصرف‌کنندگان می‌گردد، در کنار فساد میکروبی از مهم‌ترین عوامل کاهش زمان ماندگاری نان محسوب می‌شود (Bechtel *et al*., 1953; Katina, 2005). وقایع پیچیده‌ای نظیر بلوری شدن نشاسته در بیاتی نان اهمیت دارند و عموما بیاتی با سفت شدن بافت نان همراه است. علیرغم مطالعات گسترده در حوزه صنعت نانوایی، راهکار کاملا موثری جهت ممانعت از بیاتی نان ارائه نشده و هنوز هم از بیاتی به‌عنوان یک معضل اساسی در کاهش کیفیت این محصول، نام برده می‌شود (Gray & Bemiller, 2003). تازه نگه داشتن و جلوگیری از بیاتی نان و سایر فرآورده‌های صنایع پخت از اهداف مهم و تخصصی است که از جنبه‌های اقتصادی و تغذیه‌ای از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار می‌باشد (Shahedi, 2002). یکی از راهکارهای ارائه شده جهت کاهش بیاتی نان استفاده از خمیرترش است (Corsetti *et al*., 1998; Clarke & Arendt, 2005).

خمیرترش، شامل مخلوطی از آرد (یا اجزاء آن) و آب است که به‌وسیله مخمرها و باکتری‌های اسید لاکتیک، تخمیر شده باشد (Devuyst & Neysens, 2005; Corsetti & Settanni, 2007). براساس فناوری تولید، خمیرترش‌ها به سه نوع سنّتی، صنعتی خشک شده و صنعتی مایع تقسیم می‌گردند که در صنعت، خمیرترش‌های مایع بسیار مورد توجه قرار گرفتند اما این نوع خمیرترش‌ها به مرحله اسیدی شدن سریع‌تری نیاز دارند (Devuyst & Neysens, 2005). عمده‌ترین باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش به جنس

۱، ۲، ۳ و۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، استاد و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
(* - نویسنده مسئول: Email: Sadeghi.gau@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.41459

لاکتوباسیلوس تعلق دارند اما جنس‌های *پدیوکوکوس*، *لویکونوستوک* و *انتروکوکوس* نیز گاهی اوقات در خمیرترش حضور دارند. این میکروارگانیسم‌ها، خصوصیات نان از جمله حجم، خصوصیات پوسته، دانه‌بندی و رنگ مغز نان، طعم، آروما و بافت آن را بهبود داده و با جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مولّد فساد باعث افزایش زمان ماندگاری نان می‌شوند (Gobbetti, 1998; Lonner *et al*.,1986). کنترل شرایط تخمیر (دما، زمان، آغازگر میکروبی و ترکیبات تغذیه‌ای) جهت رسیدن به سطح مناسبی از pH و اسیدیته قابل تیتر خمیرترش به‌منظور بهره‌مندی از آثار مفید آن در فرآوری نان اهمیت دارد (Hammes *et al*., 2005; Clarke & Arendt, 2005).

اسیدی شدن زیستی یک فرایند کلیدی در تخمیر خمیرترش محسوب می‌شود. با توجه به مطالعات صورت گرفته اسیدی شدن شیمیایی، در طی هر دوره تخمیر تاثیر قابل توجهی در بهبود حجم قرص نان تولیدی نخواهد داشت (Clarke *et al*., 2002). محصول عمده تخمیر فرآورده‌های غنی از فیبرهای رژیمی توسط خمیرترش نیز اسید آلی است که بر روی اجزای نشاسته و پروتئین آرد تاثیر گذاشته و با کاهش pH سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز آرد و تغییر رفتار گلوتن شده و لذا در کاهش بیاتی نان تاثیر دارد (Katina *et al*., 2004; Arendt *et al*., 2007). تاثیر خمیرترش در به تاخیر انداختن بیاتی اصولا به واسطه بهبود حجم و افزایش نرمی بافت نان می‌باشد. خمیرترش با تنظیم فعالیت آنزیمی آرد، میزان هیدرولیز نشاسته را تغییر داده و در نهایت باعث کاهش بلوری شدن نشاسته و کاهش بیاتی نان می‌گردد (Katina, 2005). برخی از متابولیت‌های تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در خمیرترش نظیر پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و آنزیم‌های پروتئولیتیک و آمیلولیتیک در تاخیر بیاتی نان تولیدی موثر هستند (Korakli *et al*., 2003; Katina *et al*., 2006).

Maleki و همکاران (۱۹۸۰) با بررسی تاثیر فعالیت باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در خمیرترش دریافتند که این میکروارگانیسم‌ها با افزایش حجم مخصوص نان، سبب کاهش نرخ بیاتی محصول تولیدی می‌شوند. Korakli و همکاران (۲۰۰۳) نیز عملکرد اگزوپلی‌ساکاریدهای تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک در حین تخمیر خمیرترش که با افزایش میزان جذب آب همراه بود را بررسی نموده و نتیجه گرفتند که این ترکیبات باعث جلوگیری از انتقال رطوبت از مغز به پوسته نان و به تعویق انداختن بیاتی آن می‌گردند. علاوه بر این ترکیبات مذکور، تاثیر قابل توجهی در افزایش حجم و بهبود زمان ماندگاری نان داشتند. Gul و همکاران (۲۰۰۵) نیز تاثیر باکتری‌های اسید لاکتیک را در افزایش زمان ماندگاری نان و به تاخیر انداختن بیاتی آن مطالعه نمودند. بر اساس نتایج این پژوهشگران تمامی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده عملکرد مشابهی در ممانعت از بیاتی و بهبود ویژگی‌های حسّی نان تولیدی نداشتند. به نحوی که به ترتیب استفاده از *لاکتوباسیلوس آمیلوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس سیکی* منجر به بروز بهترین خصوصیات رئولوژیکی و بهترین ویژگی‌های حسّی در نان تولیدی گردید. Katina و همکاران (۲۰۰۶) با ارزیابی عملکرد آنزیم‌های پروتئولیتیک و آمیلولیتیک حاصل از باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در خمیرترش دریافتند که ترکیبات مذکور، بیاتی نان را به میزان زیادی به تاخیر می‌اندازند. Devuyst و Vancanneyt (۲۰۰۷) نیز با بررسی تاثیر تخمیر خمیرترش بر روی ویژگی‌های نان گزارش نمودند که به موازات افزایش زمان تخمیر، بهبود حجم، بافت و طعم نان و همچنین ممانعت از فسادهای قارچی و باکتریایی و به تاخیر انداختن بیاتی آن مشهودتر است. Sadeghi و همکاران (۲۰۰۸) نیز به بررسی تاثیر باکتری‌های اسیدلاکتیک خمیرترش بر زمان ماندگاری نان بربری پرداختند و دریافتند که در فاصله زمانی ۷۲ ساعت پس از پخت، نان فرآوری شده با باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در دمای تخمیر ۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان تخمیر ۲۴ ساعت بیشترین مقدار افزایش حجم و کمترین میزان بیاتی را دارا بود. هدف اصلی از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر استفاده از آغازگر *لاکتوباسیلوس* غالب جدا شده از یک نمونه خمیرترش سنّتی و کنترل شرایط موثر بر تخمیر آن نظیر زمان تخمیر (در محدوده ۸ تا ۲۴ساعت)، غلظت شکر (در محدوده ۰/۵ تا ۱/۵ درصد) و ترکیبات آرد کامل گندم جهت فرآوری نان قالبی و همچنین ارزیابی تاثیر این عوامل بر بیاتی نان تولیدی بود.

مواد و روش‌ها

مواد

آرد گندم کامل مورد استفاده در این پژوهش از سازمان غلّه مشهد بر اساس استانداردهای ملّی ایران (۱۳۸۱) تهیه شد. آرد مصرفی با ۹۲ درصد استخراج، دارای ۸/۱۰ درصد رطوبت، ۱۲/۲۵درصد پروتئین،۲۶/۴۰ درصد گلوتن مرطوب و ۱/۵۵ درصد خاکستر (بر اساس وزن خشک) بود. این مقادیر بر اساس روش‌های مدون (AOAC, 2003 و AACC, 2010) تعیین گردید. مخمر خشک فعال *ساکارومایسس سرویزیه* از شرکت ایران ملاس فریمان تهیه شد. محیط کشت‌های مصرفی شامل MRS Broth، MRS Agar و Nutrient Broth نیز از شرکت‌های مرک آلمان و آکومدیای آمریکا تهیه شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش نیز از شرکت مرک آلمان تهیه گردیدند.

تهیه خمیرترش سنّتی از آرد کامل گندم

خمیرترش سنّتی با مخلوط نمودن آرد و آب، بدون افزودن آغازگر میکروبی و با تخمیر خود به خودی خمیر تهیه گردید (& Devuyst Neysens, 2005). بدین منظور نسبت‌های ۳۵ تا ۶۵ درصد از آرد

کامل گندم با آب، مخلوط شد و در دمای ثابت ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تخمیر گردید. سپس جهت غالب شدن *لاکتوباسیلوس* موجود در خمیرترش از فرایند مایه‌گیری[۱] استفاده شد. در هر مرحله از مایه‌گیری ۲۵ درصد وزنی از خمیرترش تخمیر شده قبلی با ۷۵ درصد از مخلوط آب و آرد تا چندین مرحله تخمیر گردید. در هر مرحله pH و اسیدیته قابل تیتر خمیرترش نیز اندازه‌گیری شد (Venturi *et al*., 2013).

جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس* غالب موجود در خمیرترش سنّتی

پس از تهیه خمیرترش، کشت سطحی آن در محیط کشت اختصاصی MRS Agar جهت شمارش پرگنه‌های غالب و در ادامه کشت خطی پرگنه‌های رشدکرده در محیط کشت مذکور با هدف دستیابی به تک پرگنه‌های خالص انجام شد. سپس با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژی نظیر آزمون کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم، شناسایی اولیه آغازگرهای *لاکتوباسیلوس* غالب صورت گرفت. در ادامه DNA این پرگنه‌ها، استخراج (بیونیر، AccuPrep K-3032، کره جنوبی) و توسط PCR دارای پرایمر اختصاصی، تکثیر و متعاقبا محصولات PCR، توالی‌یابی (شرکت MWG آلمان) شد (Ferchichi *et al*., 2007). شرایط واکنش این آزمون و پرایمرهای مورد استفاده در جدول (۱) آمده است.

واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، شامل یک واحد بافر استاندارد PCR، ۲۵ پیکامول از هر پرایمر، مخلوطی از هر dNTP با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، ۲۵ میکروگرم سرم آلبومین، Taq پلیمراز با فعالیت ۲/۵ واحد (روبوست، فرانسه) و ۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم انجام شد. سپس در مرحله اول تکثیر، واسرشت DNA با شروع داغ در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، آغاز گشته و طی ۳۵ چرخه با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه ادامه یافت. سرانجام مرحله تکثیر انتهایی نیز به مدت ۷ دقیقه در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد (ترموسایکلر کوربت، مدل CG1-96، استرالیا) خاتمه پیدا کرد (Ferchichi *et al*., 2007).

تهیه خمیرترش طی تخمیرکنترل شده با استفاده ازکشت آغازگر اختصاصی

برای تهیه خمیرترش کنترل شده، ابتدا گونه *لاکتوباسیلوس* غالب جدا شده در محیط کشت MRS Broth در دمای ۳۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. لاکتوباسیل‌ها تا ایجاد $۱۰^۸$ واحد تشکیل‌دهنده پرگنه در گرم (در مقایسه با لوله ۰/۵ مک فارلند) رشد کردند. برای جداسازی سلول‌های تازه میکروبی، زیست توده تولیدی توسط سانتریفوژ (هانیل، Combi 514R، کره جنوبی) با ۵۰۰۰g در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه از محیط کشت جدا شدند (Dalbello *et al*., 2007). سپس برای تهیه خمیرترش، نسبت یکسان از آب و آرد با *لاکتوباسیلوس* غالب جدا شده از خمیرترش سنّتی (معادل ۱/۵ درصد وزنی آرد) به همراه ۰/۲۵ درصد وزنی از مخمر نانوایی مخلوط گردید و تحت تاثیر زمان‌های مختلف تخمیر(۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت) و همچنین غلظت‌های متفاوت شکر (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد)، تخمیر شد. دمای تخمیر خمیرترش، معادل دمای بهینه فعالیت *لاکتوباسیلوس*‌ها (۲۸ درجه سانتی‌گراد) در نظر گرفته شد (Meignen *et al*., 2001; Diowksz & Ambroziak, 2006; Chavan & Jana, 2008).

ارزیابی میزان اسیدیته قابل تیتر خمیرترش

برای تعیین اسیدیته قابل تیتر خمیرترش (بر حسب اسید لاکتیک)، معادل ۱۰ گرم از خمیرترش مورد نظر با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر، مخلوط و یکنواخت شد. سپس محلول مذکور توسط NaOH با نرمالیته ۰/۱ تا pH معادل ۸/۵ تیتر شد و اسیدیته بر حسب میلی‌لیتر NaOH مصرفی محاسبه گردید (Katina, 2005).

تهیه نان فاقد خمیرترش (شاهد)

برای تهیه نان شاهد از مخلوط آرد، آب و ۱/۵ درصد وزنی از مخمر خشک فعال حاوی *ساکارومایسس سرویزیه* استفاده شد. میزان آب مورد نیاز معادل ۶۰ درصد و همچنین شرایط مخلوط کردن برای تهیه خمیر نان قالبی حاصل از آرد کامل گندم با استفاده از فارینوگراف (برابندر، انگلستان) تعیین شد. خمیر نان شاهد فاقد خمیرترش بوده و مرحله نخست تخمیر این مخلوط در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و تخمیر نهایی پس از تقسیم کردن به قطعات ۵۰ گرمی در دمای مشابه به مدت ۹۰ دقیقه صورت پذیرفت. سپس نمونه‌های تولیدی در دمای ۵±۲۲۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه در فر پخت (Leisure، ایتالیا)، پخته شدند (Meignen *et al*., 2001).

تهیه نان با استفاده از خمیرترش‌های تولیدی

برای تهیه نان خمیرترشی، نسبت ۲۵ درصد وزنی از خمیرترش به خمیر مشابه نمونه شاهد افزوده شده و سپس تحت شرایط یکسان تخمیر و پخت با نمونه شاهد، فرآوری گردید. مقدار خمیرترش مذکور قبل از تخمیر نهایی به خمیر افزوده شد. نان تولیدی پس از پخت حدود دو ساعت در شرایط بهداشتی، سرد و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت (Dalbello *et al*., 2007; Katina *et al*., 2007).

---

۱ Refreshing

ارزیابی سفتی بافت مغز نان با استفاده از دستگاه بافت‌سنج به‌عنوان معیاری از بیاتی

بدین منظور ابتدا قطعات مستطیلی شکل با ضخامت ۲±۲۰ میلی‌متر از مرکز هندسی نان بریده شد. سپس با استفاده از دستگاه بافت‌سنج (مدل TAXT Plus Stable Micro System، انگلستان)، نیروی لازم جهت ایجاد ۵۰ درصد فشردگی در ضخامت اولیه به عنوان سفتی بافت مغز نان اندازه‌گیری گردید. سرعت پروب مورد استفاده در آزمون تراکمی ۱ میلی‌متر در ثانیه و نقطه شروع ۵۰ گرم بود. برای هر نمونه نان، آزمون مذکور با سه تکرار در دمای اتاق انجام شد. حداکثر نیروی لازم برای نفوذ پروب در نمونه، به‌عنوان سفتی پوسته نان در نظر گرفته شد. با رسم منحنی نیرو- فاصله، نیروی متناظر با نصف ضخامت نمونه به‌عنوان نیروی لازم برای پنجاه درصد فشردگی که بیانگر سفتی مغز نان است تعیین گردید. در نهایت سفتی بافت مغز نان در تناوب‌های زمانی ۲، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از پخت برای تخمین بیاتی مغز نان مورد ارزیابی قرار گرفت (Corsetti *et al*., 1998; Katina *et al*., 2007).

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای آزمون PCR شناسایی سویه‌های *لاکتوباسیلوس*

میزان اختصاصیت پرایمر	۳′ ۵ به′ توالی پرایمر	طول توالی هدف	مرجع
باکتری‌های اسید لاکتیک	F: GAACGCGAAGAACCTTAC R: GCGTGTGTACAAGACCC	۵۰۰ جفت باز	Ferchichi *et al*., 2007

اندازه‌گیری میزان تخلخل مغز نان

برای ارزیابی میزان تخلخل مغز نان در فاصله زمانی ۲ ساعت پس از پخت، از تکنیک پردازش تصویر استفاده شد. بدین منظور برشی به ابعاد ۲ در ۲ سانتی‌متر از مغز نان تهیه گردید و به‌وسیله اسکنر (مدل Merryking-Dv,2455، چین) با وضوح ۳۰۰ پیکسل، تصویر برداری شد. سپس تصویر تهیه شده در اختیار نرم افزار Image J قرارگرفت. در ادامه با فعال کردن قسمت ۸ بیت، تصاویر با سطح خاکستری ایجاد شد و برای تبدیل تصاویر خاکستری به تصاویر دودی، قسمت دودی نرم‌افزار فعال گردید. تصاویر موجود در این نرم افزار، مجموعه‌ای از نقاط روشن و تاریک است که با محاسبه نسبت نقاط روشن به تاریک به‌عنوان شاخصی از میزان تخلخل در نمونه‌ها برآورد می‌گردد. بدیهی است که هر چقدر این نسبت بیشتر باشد میزان حفرات موجود در بافت نان (میزان تخلخل) بیشتر بوده و با فعال کردن قسمت Analysis نرم‌افزار می‌توان این نسبت را محاسبه و درصد تخلخل نمونه‌ها را اندازه‌گیری نمود (Haralick *et al*.,1973).

ارزیابی خصوصیات حسّی نان‌های تولیدی

خصوصیات حسّی نان‌های تولیدی در فاصله زمانی ۲ ساعت پس از پخت، از طریق آزمون چشایی بر اساس روش (AOAC, 2003) ارزیابی شد. ده داور از بین افراد آموزش دیده، خصوصیات نان‌های تولیدی را جهت تعیین میزان پذیرش کلّی، رنگ پوسته نان، قابلیت جویدن، سفتی بافت، طعم اسیدی، تخلخل و خاصیت ارتجاعی بر مبنای مقیاس ۵-۱ (۱کمترین و ۵ بالاترین امتیاز) ارزیابی کردند و در نهایت با اعمال ضریب ارزشیابی برای هر صفت، پذیرش کلّی کیفیت نان با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید (Katina *et al*., 2006).

$$\sum(P\times G)/\sum(P) \qquad (۱)$$

Q= پذیرش کلّی (عدد کیفیت نان)، P= ضریب رتبه صفات و G= ضریب ارزیابی صفات.

تعیین میزان آلودگی میکروبی

برای ارزیابی آلودگی میکروبی ابتدا از قسمت‌های مختلف بهترین نان‌های تولیدی، نمونه‌برداری شده و در هاون چینی استریل، همگن گردید. سپس از نمونه مذکور، رقت‌های مختلف تا 10^{-5} تهیه شد. در ادامه از محیط کشت PCA[۲] برای شمارش کلّی و PDA[۳] برای شمارش کپک و مخمر استفاده گردید. پلیت‌های کشت شده به‌ترتیب در دماهای ۳۷ و۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، با شمارش مستقیم کلنی‌ها، نتایج به‌صورت Log cfu/g گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نتایج حاصل از این پژوهش بر اساس طرح آماری پایه کاملا تصادفی به روش فاکتوریل، در سه تکرار و با استفاده از نرم‌افزارهای SAS (نسخه ۹،۱)، SPSS (نسخه ۱۶)، Microsoft Office Excel (۲۰۱۳)، Sigma plot، Design Expert، Curve Expert مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) و آزمون دانکن در سطح ۹۵٪ انجام شد.

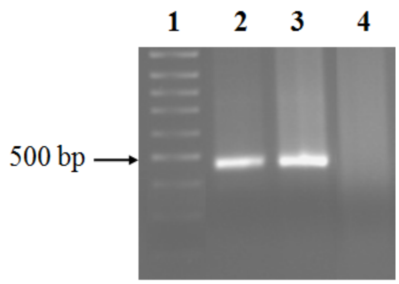
---
۲. Plate Count Agar

۳. Potato Dextrose Agar

نتایج و بحث

شناسایی آغازگر *لاکتوباسیلوس* غالب جدا شده از خمیرترش سنّتی

ارزیابی اولیه تکثیر DNA تک پرگنه‌های حاصل از کشت خطی سوسپانسیون میکروبی خمیرترش سنّتی با ژل الکتروفورز محصولات تولیدی، تایید گردید (شکل۱).

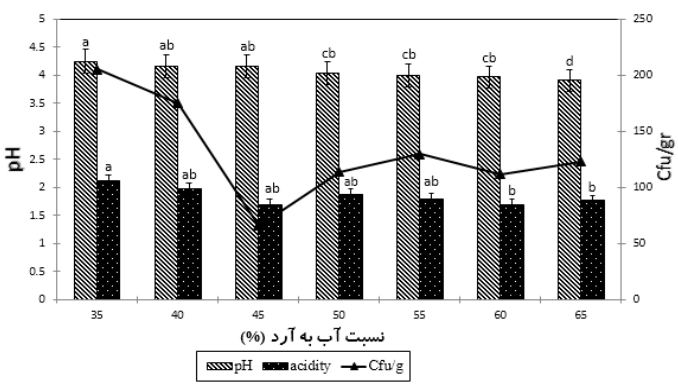


شکل۱- ژل الکتروفورز محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی با توالی هدف ۵۰۰ جفت بازی جهت شناسایی پرگنه لاکتوباسیلوس-های غالب موجود در سوسپانسیون میکروبی خمیرترش سنّتی (لاین ۲) در مجاورت مارکر صد جفت بازی (لاین ۱) و همچنین نمونه‌های کنترل مثبت حاوی DNA حاصل از کشت خالص *Lactobacillus* spp. (لاین ۳) و کنترل منفی یا فاقد باکتری (لاین ٤).

نتایج توالی‌یابی محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی از DNA این تک پرگنه‌ها نیز پس از مقایسه توالی‌های مذکور با داده-های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و RDP منجر به شناسایی لاکتوباسیلوس غالب موجود در این سوسپانسیون میکروبی (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) شد.

تغییرات اسیدیته قابل تیتر خمیرترش در تخمیرکنترل نشده

روند تغییرات اسیدیته قابل تیتر، تعداد واحد تشکیل‌دهنده پرگنه در خمیرترش حاصل از تخمیر کنترل نشده در شکل ۲ نشان داده شده است. آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین تغییرات اسیدیته قابل تیتر و pH خمیرترش حاصل از آرد کامل گندم در طی تخمیرکنترل نشده، در یک بازه زمانی و دمایی ثابت (یک شبانه‌روز در دمای محیط) در سطح ۹۵ درصد نشان داد که در نسبت‌های مختلف آب به آرد، تغییرات اسیدیته و pH از روند مشخصی تبعیت نکرده و رابطه معنی‌داری (P>۰/۰۵) بین نسبت آب به آرد با میزان اسیدیته و pH وجود ندارد. بیشترین و کمترین مقادیر اسیدیته قابل تیتر در تخمیر کنترل نشده نیز مربوط به نسبت‌های ۳۵ و ۶۰ درصد آب به آرد بود. بر اساس گزارش Reale و همکاران (۲۰۰۵)، با افزایش نسبت آب به آرد، تغییرات اسیدیته از روند مشخصی تبعیت نمی‌کند.

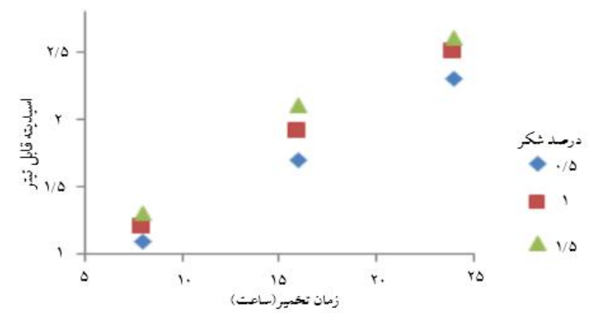


شکل۲- بررسی تغییرات اسیدیته قابل تیتر، pH و تعداد واحد تشکیل‌دهنده پرگنه برگرم از باکتری‌های اسید لاکتیک در تخمیر کنترل نشده خمیرترش حاصل از نسبت‌های مختلف آب و آرد (حروف نامشابه، نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح α=۰/۰۵ می‌باشد).

تغییرات اسیدیته قابل تیتر خمیرترش حاصل از تخمیرکنترل شده

روند تغییرات اسیدیته قابل تیتر خمیرترش به‌عنوان تابعی از زمان تخمیر و غلظت شکر در تخمیرکنترل شده در شکل (۳) نشان داده شده است. بر این اساس با افزایش زمان تخمیر در محدوده ۸ تا ۲۴ ساعت و افزایش غلظت شکر در محدوده ۰/۵ تا ۱/۵ درصد در دمای ثابت تخمیر (۲۸ درجه سانتی‌گراد) با تلقیح *لاکتوباسیلوس* غالب جدا شده از تخمیر کنترل نشده، اسیدیته قابل تیتر در تخمیر کنترل شده با روند مشخصی افزایش یافت. در مقایسه با تخمیر کنترل نشده، آنالیز واریانس و مقایسه میانگین تغییرات اسیدیته در سطح ۵ درصد نشان داد که در یک نسبت ثابت آب به آرد، سطوح مختلف زمان تخمیر و درصد شکر تاثیر معنی‌داری (P≤۰/۰۵) بر میزان تغییرات اسیدیته قابل

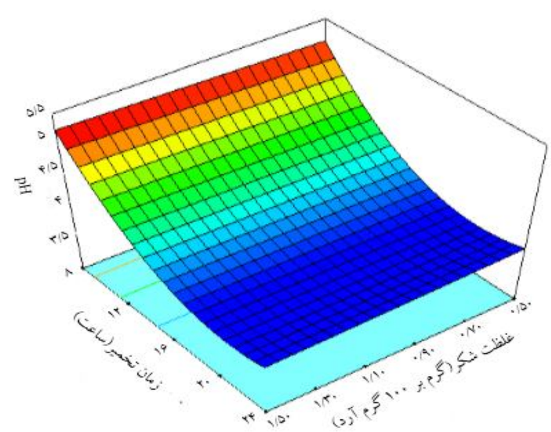
تیتر خمیرترش دارند. بیشترین مقدار اسیدیته قابل تیتر در تخمیر کنترل شده در نمونه حاصل از ۲۴ ساعت تخمیر و محتوی ۱/۵ درصد شکر و کمترین مقدار آن نیز در نمونه حاصل از ۸ ساعت تخمیر با محتوی ۰/۵ درصد شکر مشاهده گردید. محققین مختلفی نظیر Gul و همکاران (۲۰۰۵)، Meignen و همکاران (۲۰۰۱) و همچنین Katina (۲۰۰۵) نتایج مشابهی گزارش کرده‌اند. براساس گزارش این محققان، به موازات افزایش زمان تخمیر، اسیدیته قابل تیتر خمیرترش افزایش می‌یابد. همچنین Fuchs و Birkhed (۱۹۷۵) Brandt و Hammes (۲۰۰۱) گزارش نمودند که با افزایش درصد شکر، اسیدیته قابل تیتر خمیرترش نیز افزایش می‌یابد.



شکل۳- بررسی تغییرات اسیدیته قابل تیتر خمیرترش بر حسب اسید لاکتیک تحت تاثیر زمان تخمیر و غلظت شکر.

تغییرات pH خمیرترش حاصل از آرد کامل گندم در تخمیرکنترل شده

روند تغییرات pH خمیرترش به‌عنوان تابعی از زمان تخمیر و غلظت شکر در شرایط تخمیرکنترل شده در شکل (۴) نشان داده شده است. با افزایش زمان تخمیر در محدوده ۸ تا ۲۴ ساعت و همچنین افزایش غلظت شکر در محدود ۰/۵ تا ۱/۵ درصد، در دمای ثابت تخمیر (۲۸ درجه سانتی‌گراد) با تلقیح *لاکتوباسیلوس* غالب جدا شده از تخمیر کنترل نشده، pH خمیرترش حاصل از آرد کامل گندم در تخمیر کنترل شده با روند مشخصی کاهش یافت. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین تغییرات pH در سطح ۵ درصد نشان داد که در یک نسبت ثابت آب به آرد، زمان تخمیر و درصد شکر، تاثیر معنی‌داری ($P\leq 0/05$) بر میزان تغییرات pH دارند به‌نحوی که بیشترین و کمترین مقدار pH در تخمیر کنترل شده به ترتیب در نمونه حاصل از ۸ ساعت تخمیر و محتوی ۰/۵ درصد شکر و همچنین نمونه حاصل از 24 ساعت تخمیر با محتوی ۱/۵ درصد شکر مشاهده گردید. این نتایج با یافته‌های Meignen و همکاران (۲۰۰۱) و Katina (۲۰۰۵)، همخوانی دارد. بر این اساس، در شرایطی که با افزایش زمان تخمیر، pH کاهش می‌یابد معمولا حضور *لاکتوباسیلوس‌های* هوموفرمنتاتیو محتمل‌تر است.



شکل٤- بررسی تغییرات pH خمیرترش تحت تاثیر زمان تخمیر و غلظت شکر.

ارزیابی سفتی بافت نان

جدول(۲) نتایج حاصل از آزمون اندازه‌گیری سفتی مغز نان با دستگاه بافت‌سنج در نان‌های تهیه شده از تیمارهای متفاوت خمیرترش حاصل از تخمیر کنترل شده در طی دوره نگهداری را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود نیروی لازم برای فشردن نان با گذشت زمان افزایش می‌یابد. در بین نمونه‌های تولیدی، کمترین سفتی بافت در نمونه فرآوری شده طی ۲۴ ساعت تخمیر و غلظت ۰/۵ درصد شکر مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان سفتی بافت در مقایسه با نمونه شاهد مربوط به نمونه فرآوری شده طی ۸ ساعت تخمیر و غلظت ۱/۵درصد شکر پس از ۹۶ ساعت نگهداری بود. بر این اساس، عوامل موثر بر تخمیر خمیرترش (زمان و مقدار شکر) تاثیر بسزایی بر سفتی بافت نان تولیدی داشتند که تاکیدی بر نقش متابولیت‌های میکروبی تولید شده در شرایط مذکور بود. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین تغییرات سفتی بافت نان در سطح ۵ درصد نیز تاثیر شرایط اعمال شده در این پژوهش را بر میزان تغییرات سفتی بافت نان مشخص نمود. با توجه به تحقیقات Martin و Hoseney (۱۹۹۱) در حین پخت پس از متورم شدن نشاسته، پیوندهای عرضی بین نشاسته و گلوتن تشکیل گردیده که در طی نگهداری نان و به دنبال کاهش انرژی جنبشی به تغییرات فیزیکوشیمیایی و سفتی مغز نان منجر می‌گردد. بیاتی نان فرآیند پیچیده‌ای است که آن را به برگشت به عقب نشاسته نسبت می‌دهند (Ribotta *et al*., 2004). همچنین Barber و همکاران (۱۹۹۲)، تولید اسیدهای آلی و هیدرولیز نشاسته به‌وسیله باکتری‌ها و Gobbetti و همکاران (۱۹۹۶)، پروتئولیز زیر واحدهای گلوتن را نیز از جمله عوامل موثر در بیاتی نان برشمرده‌اند.

جدول ۲- بررسی تغییرات سفتی بافت نان تحت تاثیر زمان تخمیر و مقدار شکر خمیرترش در طی زمان نگهداری

		مدت زمان ماندگاری		
درصد شکر	زمان تخمیر	۲ ساعت	٤۸ ساعت	۹٦ ساعت
	۰	۹/۸۵۰±۱/۶۴^{b}	۱۱/۳۹۰±۱/۶۴^{bc}	۱۲/۹۴۰±۱/۶۴^{e}
	۸	۸/۵۹۳±۲/۲۳^{bc}	۱۲/۵۶۰±۲/۲۳^{b}	۲۳/۱۴۰± ۲/۲۳^{a}
۰/۵	۱۶	۳/۳۶۲±۰/۵۳^{d}	۵/۲۹۸±۰/۵۳^{e}	۷/۱۷۵±۰/۵۳^{f}
	۲۴	۳/۳۳۹±۱/۰۹^{d}	۷/۶۷۹±۱/۰۹^{d}	۱۰/۸۶۰±۱/۰۹ ^{e}
	۰	۹/۸۰۱±۱/۶۴^{b}	۱۱/۳۰۴±۱/۶۴^{bc}	۱۲/۸۷۰±۱/۶۴^{e}
	۸	۷/۶۱۳±۱/۱۱^{c}	۱۴/۶۸۴±۱/۱۱^{a}	۱۲/۶۸۰±۱/۱۱^{d}
۱	۱۶	۱۱/۷۳۴±۱/۰۵^{a}	۱۰/۱۵۰±۱/۰۵^{c}	۱۶/۷۹۰±۱/۰۵^{b}
	۲۴	۳/۷۱۷±۰/۹۷^{d}	۸/۳۳۰±۰/۹۷^{d}	۱۰/۲۲۰±۰/۹۷^{e}
	۰	۹/۷۸۰±۱/۶۴^{b}	۱۱/۲۸۰±۱/۶۴^{bc}	۱۲/۹۹۰±۱/۶۴^{a}
	۸	۱۲/۲۰۴±۱/۸۸^{a}	۱۴/۷۸۰±۱/۸۸^{a}	۲۴/۳۲۰±۱/۸۸^{a}
۱/۵	۱۶	۴/۳۱۶±۰/۸۵^{d}	۵/۸۵۱±۰/۸۵^{e}	۹/۷۵۳±۰/۸۵^{e}
	۲۴	۷/۰۰۶±۱/۲۸^{c}	۸/۰۵۵±۱/۲۸^{d}	۱۴/۹۴۳±۱/۲۸^{c}

(حروف غیر یکسان، نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح 0/05= α می‌باشد)

نتایج حاصل از آزمون اندازه‌گیری سفتی بافت نان با دستگاه بافت‌سنج در نان‌های تهیه شده از تیمارهای متفاوت و در طی دوره ۲ ساعت نگهداری نشان داد که نیروی لازم برای فشردن نان در نمونه‌های تهیه شده از خمیرترش در زمان‌های تخمیر کوتاه‌تر، به مراتب بیشتر است که با نتایج Katina و همکاران (۲۰۰۶) نیز همخوانی داشت. احتمالا در این بازه زمانی هنوز تخمیر آغازگر انتخابی، کامل نشده و لذا متابولیت‌های میکروبی اثر مشهودی بر سفتی بافت نان تولیدی نداشتند. همچنین بافت نان‌های حاصل از تیمارهای ۱۶ و۲۴ ساعت تخمیر در طی دوره ۴۸ ساعت نگهداری با گذشت زمان، سفتی کمتری نسبت به نمونه شاهد از خود نشان دادند. به‌نظر می‌رسد که شرایط تخمیر مذکور، مناسب‌ترین شرایط برای تولید متابولیت‌های میکروبی نظیر پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و یا آنزیم‌هایی باشد که باعث نرمی بافت نان می‌شوند.

Corsetti و همکاران (۱۹۹۸)، Lacaze و همکاران (۲۰۰۷) و Arendt و همکاران (۲۰۰۷) نیز نتایج مشابهی به دست آورده‌اند. در پژوهش‌های مذکور به دنبال افزایش زمان تخمیر خصوصا در کشت‌های آغازگر حاوی گونه‌های لاکتوباسیل هموفرمنتاتیو، سفتی بافت نان تولیدی به مراتب نسبت به نمونه شاهد کمتر بود. البته در کشت‌های آغازگر حاوی گونه‌های لاکتوباسیل هتروفرمنتاتیو به دلیل تغییر در تولید متابولیت‌های اصلی و افزایش تولید ترکیبات فرار در مورد گونه‌های مختلف، نتایج متفاوتی مشاهده شده است (Thiele *et al*., 2002).

بررسی روند تغییرات سفتی بافت نان در طول زمان انبارمانی نشان داد که سفتی بافت اکثر نمونه‌ها از نمونه شاهد کمتر بود. این روند در نمونه حاصل از ۸ ساعت تخمیر مشاهده نشد که دلیل اصلی آن را می‌توان به تخمیر ناقص و عدم تولید متابولیت‌های میکروبی در طی تخمیر نسبت داد (Corsetti *et al.*, 1998). Crowely و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی عملکرد متابولیت‌های میکروبی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک در حین تخمیر خمیرترش دریافتند که این ترکیبات، مانع انتقال رطوبت از مغز به پوسته نان و به تعویق انداختن بیاتی آن می‌گردند. علاوه بر این، ترکیبات مذکور تاثیر قابل توجهی در افزایش حجم، کاهش سفتی بافت و بهبود زمان ماندگاری نان داشتند. همچنین Siljestrom و همکاران (۱۹۸۸) گزارش کردند که خمیرترش از طریق تاثیر بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز آرد باعث کاهش هیدرولیز نشاسته و آزاد شدن محدود دکسترین‌های دارای وزن مولکولی پایین می‌شوند. دکسترین‌ها تمایل کمتری به برگشت به عقب دارند. بطور کلّی در مقادیر اسیدی شدن پائین‌تر و زمان تخمیر طولانی‌تر، هیدرولیز نشاسته در نان حاصل از خمیرترش بیشتر از نان تهیه شده با مخمر نانوائی بوده و لذا بافت نرم‌تری حاصل می‌گردد. البته سویه باکتری مورد استفاده نیز حائز اهمیت است به نحوی که آغازگرهای مختلف از بین باکتری‌های اسید لاکتیک، دارای تاثیر متفاوتی در به تاخیر انداختن بیاتی نان هستند (Corsetti *et al*, 1998). در خصوص تاثیر زمان تخمیر خمیرترش بر سفتی بافت نان در طی نگهداری Corsetti و همکاران (۱۹۹۸) و همچنین Katina (۲۰۰۵) نتایج مشابهی بدست آورده‌اند. بر این اساس، خمیرترش با تنظیم فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز آرد، میزان هیدرولیز نشاسته را تغییر داده و در کاهش بلوری شدن نشاسته و کاهش بیاتی نان موثر است (Clarke *et al*., 2004).

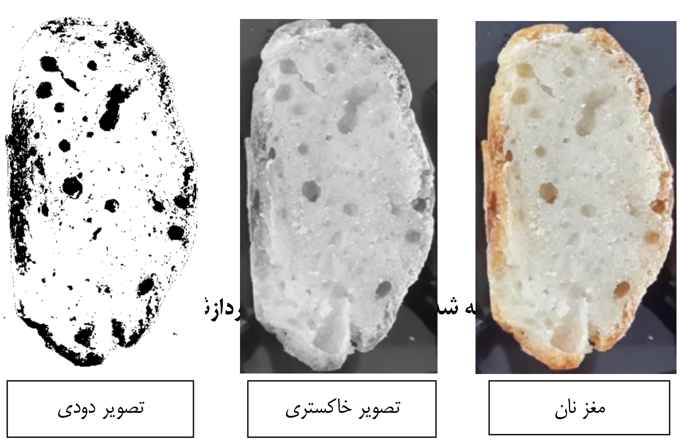
ارزیابی میزان تخلخل مغز نان

آنالیز واریانس و مقایسه میانگین تغییرات تخلخل مغز نان در سطح ۵ درصد نشان داد که در محدوده شرایط اعمال شده در این پژوهش، زمان تخمیر و درصد شکر تاثیر معنی‌داری (P≤۰/۰۵) بر میزان تخلخل بافت نان تولیدی ۲ ساعت پس از پخت دارند. بیشترین مقدار تخلخل بافت نان در نمونه حاصل از ۲۴ ساعت تخمیر و محتوی ۱/۵ درصد شکر و کمترین مقدار آن نیز در نمونه حاصل از ۸ ساعت تخمیر با محتوی ۰/۵ درصد شکر مشاهده گردید. نتایج تجزیه واریانس و تغییرات تخلخل مغز نان تحت تاثیر تیمارهای زمان تخمیر و غلظت شکر در جدول (۳) آمده است.

جدول۳- نتایج تجزیه واریانس و تغییرات تخلخل مغز نان تحت تاثیر تیمارهای زمان تخمیر و غلظت شکر

درصد شکر	زمان تخمیر	تخلخل مغز نان
۰	۰	۰/۰۸۵ ± ۰/۰۳۱ [a]
	۷	۰/۰۳۸ ± ۰/۰۰۹ [c]
۰/۵	۱۶	۰/۰۹۰ ± ۰/۰۱۳ [a]
	۲۴	۰/۰۹۴ ± ۰/۰۱۲ [a]
	۸	۰/۰۴۷ ± ۰/۰۰۹ [bc]
۱	۱۶	۰/۰۹۸ ± ۰/۰۲۷ [a]
	۲۴	۰/۱۰۲ ± ۰/۰۰۵ [a]
	۸	۰/۰۴۸ ± ۰/۰۰۴ [bc]
۱/۵	۱۶	۰/۰۸۰ ± ۰/۰۲۶ [b]
	۲۴	۰/۱۲۷ ± ۰/۰۰۳ [a]

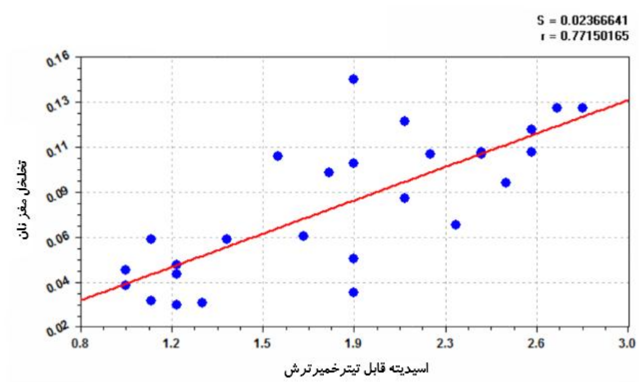
(حروف غیر یکسان، نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح α =0/05 می‌باشد)



رابطه ساختار مغز نان و بسیاری از ویژگی‌هـای کیفـی آن نظیـر تخلخل نشان داده است که خواص مکانیکی مغـز نـان بیشـتر تـابع چگونگی توزیع اجزا بوده و وابستگی کمتری به اندازه اجزا دارد. نتایج تحقیقات اخیر نشان داده است که از بین عوامل موثر بر تخلخل نان، تولید گاز در حین فرایندهای تخمیری از اهمیت بیشتری در مقایسه با روش‌های فرآوری یا مخلـوط کـردن اجـزای خمیـر برخـوردار اسـت (Shehzad *et al*., 2010).

بررسی رابطه اسیدیته قابل تیترخمیرترش با تخلخل و سفتی بافت نان

رابطه رگرسیونی تغییرات تخلخل بافت نـان بـه‌عنـوان تـابعی از اسیدیته قابل تیتر در تخمیرکنترل شده در شکل (۶) نشان داده شـده است. رابطه رگرسیونی با ضریب همبستگی ۰/۷۷۱ بین اسیدیته قابل تیتر خمیرترش و تخلخل مغز نان نشان داد کـه بـا افـزایش میـزان اسیدیته قابل تیتر خمیرترش، تخلخـل مغـز نـان افـزایش مـی‌یابـد. براساس تحقیقات صورت گرفته مهم‌ترین دلیل کـاهش بیـاتی نـان فرآوری شده با خمیرترش، تولید متابولیت‌هایی نظیر اسـیدهای آلـی می‌باشد که سبب افزایش تخلخل، تغییر در فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و افزایش نرمی بافت نان می‌گردد. استفاده از غلظت بالاتر شکر، دمای بالاتر تخمیر، افزودن مقدار آب بیشتر در خمیرترش و اسـتفاده از آرد کامل می‌تواند تولید اسید را در حین تخمیر خمیرترش افـزایش دهـد (Katina *et al*., 2007; Arendt *et al*., 2007).

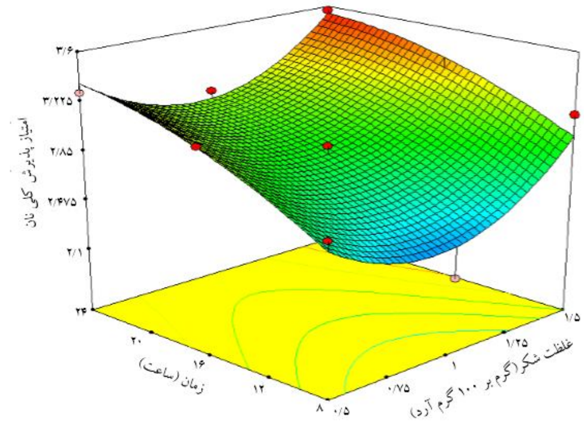


شکل٦- رابطه رگرسیونی اسیدیته قابل تیتر خمیرترش برحسب اسید لاکتیک با تخلخل مغز نان.

همچنین رابطه رگرسیونی با ضریب همبستگی ۰/۶۲۳ بین سفتی بافت نان و اسیدیته قابل تیتر خمیرترش نشـان داد کـه بـا افـزایش میزان اسیدیته قابل تیتر خمیرترش، سفتی بافت نان کاهش می‌یابد. دلیل اصلی این پدیده، تولید متابولیت‌های میکروبی توسط بـاکتری-های اسید لاکتیک در حین تخمیر خمیرترش اسـت کـه تـاثیر قابـل توجهی در افزایش حجم و کاهش سفتی بافت نان دارند (Crowely *et al*., 2003; Gomez *et al*., 2007).

ارزیابی خصوصیات حسّی نان‌های تولیدی

روند پذیرش نهایی نان‌های تازه‌خوری به عنوان تـابعی از زمـان تخمیر و غلظت شکر در شرایط تخمیرکنترل شده در شکل (۷) نشان داده شده است. براساس نتـایج حاصـل از تجزیـه و تحلیـل آمـاری، سطوح مختلف زمان تخمیر و درصد شکر تاثیر معنی‌داری ($P\leq۰/۰۵$) بر میزان پذیرش نهایی نان‌های تازه‌خوری داشـتند. میـزان پـذیرش نهایی نمونه‌های تولیدی با افزایش زمان تخمیر بهبود یافت به‌نحوی که نمونه حاصل از ۲۴ ساعت تخمیـر و محتـوی ۱/۵ درصـد شـکر، بالاترین نمره پذیرش نهایی را بدست آورد. کمتـرین مقـدار پـذیرش نهایی نیز در نمونه حاصل از ۸ ساعت تخمیر با محتوی یک درصـد شکر مشاهده شد که در مقایسه با نمونه شاهد باز هم به مراتب بالاتر بود. دلیل این موضوع به افزایش تخلخل، بهبـود احسـاس دهـانی و تولید ترکیبات مولّد عطر و طعم با گذشت زمـان تخمیـر نسـبت داده می‌شود (Katina *et al*., 2006; Thiele *et al*., 2002).



شکل۷- بررسی امتیاز پذیرش کلّی نان‌های تولیدی تحت تاثیر زمان تخمیر و غلظت شکر

تعیین میزان آلودگی میکروبی بهترین نمونه نان‌تولیدی

نتایج حاصل از کشت میکروبی نان حاصل از ۲۴ ساعت تخمیر و محتوی ۰/۵ درصد شکر (بهترین نان خمیرترشی به‌لحاظ تاخیر بیاتی) در مقایسه با نمونه شاهد پس از ۹۶ ساعت نگهداری دارای اختلاف معنی‌دار بود (جدول۴). تولید اسید مهم‌ترین عامل موثر خمیرترش در جلوگیری از فساد قارچی و باکتریایی به‌شمار می‌آید اگرچه اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس‌های* موجود در خمیرترش، حاصل ترکیبی از تولید اسید لاکتیک، pH پایین و مواد دارای خاصیت ضد میکروبی است (Simsek *et al*., 2006).

جدول ٤- مقایسه میزان آلودگی میکروبی در فاصله زمانی٤ روز پس از پخت در بهترین نان خمیرترشی با نمونه شاهد

ردیف	بهترین نان (cfu/g)	نمونه شاهد (cfu/g)
شمارش کلّی	۱/۱×۱۰^{۲} [a]	۳/۴×۱۰^{۲} [b]
شمارش کپک و مخمر	۰/۹×۱۰^{۲} [a]	۲/۹×۱۰^{۲} [b]

نتیجه‌گیری

اسید حاصل از تخمیر خمیرترش بر اجزای نشاسته و پروتئین آرد، تاثیر گذاشته و سبب افزایش تخلل و نرمی بافت نان خمیرترشی می‌شود. از سوی دیگر خمیرترش با تنظیم فعالیت آنزیمی آرد، در نهایت باعث کاهش بلوری شدن نشاسته و کاهش بیاتی نان می‌گردد. با توجه به تغییرات معنی‌دار اسیدیته قابل تیتر در تخمیرهای کنترل شده خمیرترش حاوی آغازگر *لاکتوباسیل* غالب جدا شده از خمیرترش سنّتی با مقادیر مذکور در تخمیرهای کنترل نشده در این پژوهش می‌توان دریافت که آغازگر میکروبی مورد استفاده در کنار سایر عوامل موثر بر تخمیر خمیرترش نظیر زمان و ترکیبات سوبسترا، نقش غیرقابل انکاری در کنترل این تخمیر پیچیده دارد. از سوی دیگر و با در نظر گرفتن رابطه رگرسیونی بین اسیدیته قابل تیتر خمیرترش با مقادیر سفتی بافت و میزان تخلخل به‌عنوان معیارهای بیاتی نان تولیدی، اهمیت فرایند تخمیر در کنترل بیاتی نان نیز محرز می‌شود.

منابع

AACC International. 2010. AACC methods 46-30. Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. The St. Paul.

AOAC Method. 2003. in official methods of analysis. Association of official analytical chemists. 17th Ed. Arlington.Virginia.

Arendt, E.K., Ryan, L.A.M. and Dal Bello, F. 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*. 24, 165-174.

Barber, B., Ortola, C., Barber, S., and Fernandez, F. 1992. Storage of packaged white bread. III. Effect of sourdough and addition of acids on bread characteristics. *ZLebensm Unters Forsch*. 194, 442-449.

Bechtel, W.G., Meisner, D.F., and Bradley, W.B. 1953. The effect of crust on the staling of bread. *Cereal Chemistry*. 30, 160-168.

Birkhed, D., and Fuchs, G. 1975. Influence of sugar content in soft bread on pH of human dental plaque. Acta Odont. 33, 59-66.

Brandt, M.J., and Hammes, W.P. 2001. Einfluß von Fructosanen auf die Sauerteig fermentation. Getreide, *Mehl und Brot.* 55, 341-345.

Clarke, C.I., and Arendt, E.K. 2005. A review of the application of sourdough technology to wheat breads. *Advance in*

Food and Nutrition Research. 49, 137-156.

Clarke, C.I., Schober, T.J., Dockery, P., O'Sullivan, K., and Arendt, E.K. 2004. Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chemistry*. 81, 409-417.

Clarke, C.I., Schober, T.J. and Arendt, E.K. 2002. Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and on bread quality. *Cereal Chemistry*. 79, 640-647.

Corsetti, A., Gobbetti, M., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L., and Rossi, J. 1998. Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. *Journal of Food Science and Technology*. 63, 347–351.

Corsetti, A., and Settanni, L. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. Food Research International. 40, 539-558.

Crowely, P., Schober, T.J., Clark, C.I., and Arendt, E.K. 2003. The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread. *European Food Research Technology*. 214, 489-496.

Chavan, R.S., and Jana, A. 2008. Frozen dough for bread making a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 2, 9-27.

Dalbello, F., Clarke, C.I., Ryan, L.A.M., Ulmer, H., Schober, T.J., Strom, K., Sjogren, J., van Sinderen, D., Schnurer, J. and Arendt, E.K. 2007. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain Lactobacillus plantarum FST 1.7. *Journal of Cereal Science*. 45, 309-318.

Devuyst, L., and Neysens, p. 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food* Science & Technology. 16, 43–56.

Devuyst, L., and Vancanneyt, M. 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 24, 120–127.

Diowksz, A., and Ambroziak, W. 2006. Sourdough. In: Hui, Y.H., Corke, H., De Leyn, I., Nip, and W.K., Cross, N.A. (Eds). Bakery Products. Food Science and Technology. Oxford: *Blackwell publishing*. 365–388.

Ferchichi, M., Valcheva, R., vost, H., Onno, B., and Dousset, X. 2007. Molecular identification of the microbiota of french sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 24, 678–686.

Gobbetti, M. 1998. The sourdough microflora, Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trend in Food Science and Technology*. 9, 267–274.

Gobbetti, M., Smacchi, E., Fox, P., Stepaniak, L. and Corsetti, A. 1996. The sourdough microflora. Cellular localization and characterization of proteolytic enzymes in lactic acid bacteria. LWT *Food Science and Technology*. 29, 561-569.

Gomez, M., Ronda, F., Caballero, P.A., Blanco, C.A., Rosell, C.M. 2007. Functionality of different hydrocolloids on the quality and shelf-life of yellow layer cakes. *Food Hydrocolloids*. 21, 167–173.

Gray, J., and Bemiller, J. 2003. Bread staling, Molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2, 1–21.

Gul, H., zcelik, S., Sagdic, O., and Certel, M. 2005. Sourdough bread production with Lactobacilli and S. cerevisiae isolated from sourdoughs. *Process Biochemistry*. 40, 691-697.

Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, M., Seitter, F.H., and Vogelmann, S. 2005. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science and Technology*. 16, 4–11.

Haralick, R.M., Shanmugam, K., and Dinstein, I. 1973. Textural features for image classification. IEEE Transactions of ASAE. 45, 1995-2005.

Izydorczyk, M.S., and Dexter, E. 2008. Barley b-glucan sand arabinoxylans molecular structure, physicochemical properties. *International Journal of food Properties*. 7, 2850-857.

Katina, K., 2005, Sourdough a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. VTT Technical Research Centre of Finland, *VTT publication* 569. 13-41.

Katina, K., Heinio, R.L., Autio, K., and Poutanen, K. 2006. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT Food Science and Technology*. 39, 1189–1202.

Katina, K., Liukkonen, K.H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S.M., Lampi, A.M., Pihlava, J.M., and Poutanen, K. 2007. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*. 46, 348–355.

Katina, K., Poutanen, K., and Autio, K. 2004. Influence and interactions of processing conditions and starter culture on formation of acids ,volatile compounds and amino acids in wheat sourdoughs. *Cereal Chemistry*. 81, 598–610.

Korakli, A., Pavlovic, M., Michael, G., and Rudif, V. 2003. Exopolysaccharide and kestose production by Lactobacillus sanfranciscensis LTH 2590. *Applied and Environment Microbiology*. 69, 2073–2079.

Lacaze, G., Wick, M., and Cappelle, S. 2007. Emerging fermentation technologies: Development of novel sourdoughs. *Food Microbiology*. 24, 155-160.

Lonner, C., Welander, T., Malin, N., and Dostalek, M. 1986. The microflora in a sourdough started spontaneously on typical Swedish rye meal. *Food Microbiology*. 3, 3–12.

Maleki, M., Hoseney, R.C., and Mattern, P.J. 1980. Effects of loaf volume, moisture content and protein quality on the softness and staling rate of bread. *Cereal Chemistry*. 57, 138-140.

Martin, M.L., and Hoseney, R.C. 1991. A mechanism of bread firming. Role of starch hydrolyzing enzymes. Journal of *Cereal Chemistry*. 68, 503-507.

Meignen, B., Onno, B., Gelinas, P., Infantes, M., Guilois, S., and Cahagnier, B. 2001. Optimization of sourdough fermentation with Lactobacillus brevis and baker's yeast. *Food Microbiology*. 18, 239-245.

Reale, A., Tremonte, P., Succi, M., Sorrentino, E., and Coppola, R. 2005. Exploration of lactic acid bacteria ecosystem of sourdoughs from the Molise region. *Annals of Microbiology*. 55, 17–22.

Ribotta, P.D., Cuffini, S., Leon, A.E., and Anon, M.C. 2004. The staling of bread: an X-ray diffraction study. European *Food Research Technology*. 218, 219-223.

Sadeghi, A., Shahidi, F., Mortazavi, A., and Nassirimahallati, M. 2008. Evaluation of Lactobacillus sanfransicenis (ATCC 14917) and Lactobacillus plantarum (ATCC 43332) effects on Iranian Barbari bread shelf life. *African Journal of Biotechnology*. 7, 3346-3351.

Siljestrom, M., Bjorck, I., Eliasson, A.C., Lonner, C., Nyman, M., and Asp, N.G. 1988. Effect of polysaccharides during baking and storage of bread. In vitro and in vivo studies. *Cereal Chemistry*. 65, 1-8.

Simsek, O., Hilmi Con, A. and Tulumoglu, S. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*. 17, 263-270.

Shahedi, M. 2002. Factors affecting on the shelf life of bread. First report of wheat production and consumption. Faculty of Agriculture, Tehran University (in Persian).

Shehzad, A., Chiron, H., Della Valle, G., Kansou, K., Ndiaye, A., and Reguerre, A.L. 2010. Porosity and stability of bread dough during proofing determined by video image analysis for different compositions and mixing conditions. *Food Research International*. 43, 1999–2005.

Standards of flat sangak bread. 2002. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI number 6943 (in Persian).

Thiele, C., Ganzle M.G., and Vogel, R.F. 2002. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavour. *Cereal Chemistry*. 79, 45-51.

Venturi, F., Andrich, G., Sanmartin, C., and Zinnai, A. 2013. The kinetics of fermentations in sourdough bread stored at different temperature and influence on bread quality. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 3, 134-138.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 1, Apr. May. 2017, p. 141- 154

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۶ ص.۱۵۴-۱۴۱

Evaluation the effect of dominant *Lactobacillus* starter isolated from traditional sourdough on staling of cup bread produced with whole wheat flour

A. Abedfar[٤], A. Sadeghi[2*], M.Kashaninejad[3], M. Khomeiri[4], M. Alami[4]

Received: 2014.11.19
Accepted: 2015.04.09

Introduction: Sourdough is a very complex biological system and an important modern fermentation method of cereal flours and water. Sourdough fermentation is based on lactic acid and alcoholic fermentation depending on the composition of micro flora and fermentation conditions. Commercial sourdough processes do not rely on fortuitous flora but on the use of specific starter cultures. There has also been much progress in the development of tools that allow for the selection of key sourdough microorganisms for particular activities such as those concerned with enzymatic, antimicrobial, nutritional and additive replacement aspects. Most of the beneficial properties attributed to sourdough are determined by the acidification activity of dominant *Lactobacillus* starters. Sourdough fermentation can improve texture and palatability of whole grain fiber-rich, stabilize or increase levels of various bioactive compounds, retard starch retro-gradation and improve mineral bioavailability. The acidification of the sourdough and the partial acidification of the bread dough will impact on structure-forming components like gluten, starch and arabinoxylans. The swelling of gluten in acid is a well-known effect and mild acid hydrolysis of starch in sourdough systems has also been hypothesized for delay bread staling. The objectives of this research were to apply the dominant *Lactobacillus* starter isolated from traditional sourdough for cup bread production with whole wheat flour and delay it's staling.

Materials and methods: In this study, following isolation of dominant *Lactobacillus* starter from traditional sourdough produced with whole wheat flour, the starter was identified by specific PCR. The single colonies obtained from streak plate of the sourdough culture, were subjected to species specific PCR. Afterwards, the mentioned starter was used for sourdough preparation. For this purpose, the effect of flour components (extraction rate, moisture, protein, ash and falling number), fermentation times (8, 16, 24 h) and sugar contents (0.5, 1, 1.5%) on starter activity were evaluated. pH and total titratable acidity (TTA) of sourdough treatments were measured. After processing of cup breads with sourdough treatments, the staling of these breads were also examined 2, 48 and 96 h after baking, based on crumb firmness (texture analysis) and amount of porosity (Image j method). Finally for statistical analysis a completely randomized design with factorial arrangement and 3 replications was used. To study the relationship between bread hardness and porosity with fermentation conditions, multiple linear regression was used and regression models were exhibited.

Results and Discussion: By sequencing of the PCR products (obtained from sourdough culture), dominant *Lactobacillus* starter was identified as *Lactobacillus plantarum*. The TTA profile for the sourdoughs was also quite similar (starters interestingly continue to produce acid) and by increasing of TTA, the pH values were decreased. The acid production depends on factors such as fermentation temperature, time and dough yield. In general, a higher temperature, a higher water content of sourdough and the utilization of whole meal flour enhances the production of acids in wheat sourdoughs. The effect of sourdough on softness improvement was partly due to a higher porosity. Among the bread samples, 96 h after baking, lowest crumb firmness was observed in sample produced with sourdough with 24 h fermentation and 0.5%. sugar content. The maximum amount of crumb firmness was observed in sample produced with sourdough after 8 h fermentation and 1.5% sugar content. Furthermore, the maximum amount of porosity was obtained after 24 h sourdough fermentation and 1.5% sugar content, while the lowest amount was obtained after 8 h sourdough fermentation and 0.5% sugar content. After evaluation the results of texture analysis and porosity tests, significant correlation coefficients

1, 2, 3 and 4. Former MSc student, Assistant Professor, Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
(*-Corresponding Author Email: Sadeghi.gau@gmail.com)

were established between porosity and softness, and it is reported that volume improvement is the main reason for a better shelf life in sourdough breads. The relationship between factors affecting on sourdough fermentation including fermentation time, sugar content and flour components, were also exhibited as regression models for examination texture characteristics of sourdough breads based on those viscoelastic behavior. By increasing the fermentation time in all of the sourdoughs, crumb hardness was decreased. Acids strongly influence the mixing behavior of doughs. Doughs with lower pH values require a slightly shorter mixing time and have less stability than normal doughs. Fundamental rheological evaluation of acid effect on gluten systems model indicated that both softness and elasticity of gluten were increased. Further to the direct impact of low pH on dough characteristics, secondary effects of acidification and fermentation time including changes in the activity of cereal or bacterial enzymes associated. Wheat flour proteases have optimal activity around pH=4. In addition, proteolytic enzymes with acidic pH optima in vital wheat gluten have been detected. Process requirements for optimum quality were strain-specific and different for textural improvement which should be taken in to account in designing future sourdough baking processes. According to results of this research, the influence of sourdough on bread softness during storage was depended on fermentation conditions and significant effect of sourdough process conditions on bread staling was clarified in comparison to control sample.

Keywords: Sourdough bread, staling, porosity, whole wheat flour, dominant *Lactobacillus* starter.